

EQUINE INTERLEUKIN 1 PEPTIDE, DNA CODING FOR THE SAME,  
RECOMBINED VECTOR CONTAINING THE SAME, TRANSFORMANT  
CONTAINING THE RECOMBINED VECTOR AND PRODUCTION OF  
EQUINE INTERLEUKIN 1-RESISTANT ANTIBODY

Patent Number: JP9131191

Publication date: 1997-05-20

Inventor(s): KATOU DAICHI; NAKAMURA TOMOKO; HAZAMA HIROKO; TAKAGI SHIGEMI;  
WATARI TOSHIHIRO; TSUJIMOTO HAJIME; HASEGAWA ATSUHIKO

Applicant(s): HITACHI CHEM CO LTD

Requested  
Patent: ☐ JP9131191

Application  
Number: JP19960203551 19960801

Priority Number  
(s):

IPC

Classification: C12N15/09; C07H21/04; C07K14/545; C12N1/21; C12P21/02

EC

Classification:

Equivalents:

**Abstract**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new equine interleukin 1 peptide containing a specific amino acid sequence, capable of being produced by a genetic engineering method, and useful for the cytokine therapy of the cytokine, arthritis, laminitis, etc., of horse and as an antigen for preparing an antibody.

**SOLUTION:** This new equine interleukin 1 peptide contains a sequence comprising at least five continuous amino acids in a peptide having an amino acid sequence represented by formula I or II, and is useful for the cytokine therapy of inflammatory diseases such as the cytokine, arthritis, laminitis, etc., of horse and useful as an antigen for preparing an antibody. The peptide is obtained by stratifying the peripheral blood of a healthy thoroughbred horse on HICOLL- HYPAQUE, centrifuging the blood, isolating mRNA from the obtained peripheral blood mononuclear fraction by a conventional method, synthesizing cDNA with the mRNA, cloning the cDNA in the presence of a primer comprising a part of human interleukin 1 gene by a PCR method, and subsequently expressing the obtained equine interleukin 1 gene in a host cell.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-131191

(43)公開日 平成9年(1997)5月20日

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 K 14/545			C 0 7 K 14/545	
C 1 2 N 1/21			C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02			C 1 2 P 21/02	K

審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 14 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-203551

(22)出願日 平成8年(1996)8月1日

(31)優先権主張番号 特願平7-226133

(32)優先日 平7(1995)9月4日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成7年3月6日

(社) 日本獣医学会発行の「第119回日本獣医学会講演  
要旨集」に発表

(71)出願人 000004455

日立化成工業株式会社

東京都新宿区西新宿2丁目1番1号

(72)発明者 加藤 大智

東京都台東区谷中5-6-13 第二美晴荘  
H号室

(72)発明者 中村 倫子

東京都港区白金4-10-27

(72)発明者 間 弘子

東京都世田谷区太子堂1-12-38-401

(74)代理人 弁理士 若林 邦彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ウマインターロイキン1ペプチド、それをコードするDNA、そのDNAを含む組換えベクター、その組換えベクターを含む形質転換体及び抗ウマインターロイキン1抗体の製造法

(57)【要約】

【課題】 ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン1の関係について研究する上で重要なウマインターロイキン1ペプチド、このウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNA若しくはそれに相補的なDNA、このウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNA若しくはそれに相補的なDNAを含む組換えベクター、前記ウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNA若しくはそれに相補的なDNAを含む形質転換体及び抗ウマインターロイキン1抗体の製造法を提供する。

【解決手段】 配列番号1又は2で示されるペプチド中の連続した少なくとも5個のアミノ酸からなる配列を含むウマインターロイキン1ペプチド、このペプチドをコードするDNA若しくはそれに相補的なDNA、このDNAを含む組換えベクター、この組換えベクターを含む形質転換体及び前記ペプチドを抗原として使用することを特徴とする、抗ウマインターロイキン1抗体の製造法。

A44

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1又は2で示されるペプチドの中の連続した少なくとも5個のアミノ酸からなる配列を含むウマインターロイキン1ペプチド。

【請求項2】 配列番号1で示されるペプチドである、請求項1記載のペプチド。

【請求項3】 配列番号2で示されるペプチドである、請求項1記載のペプチド。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載のペプチドをコードするDNA若しくはそれに相補的なDNA

【請求項5】 配列番号3で示される塩基配列を有する、請求項1記載のDNA。

【請求項6】 配列番号4で示される塩基配列を有する、請求項4記載のDNA。

【請求項7】 請求項4～6のいずれかに記載のDNAを含む組換えベクター。

【請求項8】 プラスミドpUC $\alpha$ である、請求項7記載の組換えベクター。

【請求項9】 プラスミドpUC $\beta$ である、請求項8記載の組換えベクター。

【請求項10】 請求項7～9のいずれかに記載の組換えベクターを含む形質転換体

【請求項11】 FERM-P-15112として寄託されている請求項10記載の形質転換体

【請求項12】 FERM-P-15113として寄託されている請求項10記載の形質転換体

【請求項13】 請求項1～3のいずれかに記載のペプチドを抗原として使用することを特徴とする、抗ウマインターロイキン1抗体の製造法

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ウマインターロイキン1ペプチド、それをコードするDNA、そのDNAを含む組換えベクター、その組換えベクターを含む形質転換体及び抗ウマインターロイキン1抗体の製造法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】馬においては、肺炎、関節炎、蹄葉炎などの炎症性疾患が临床上重要な問題となっており、サイトカインの測定やサイトカイン療法の基礎研究が重要な課題となっている。一方、内因性発熱因子及び軟骨細胞の破壊因子として炎症性サイトカインが知られている。インターロイキン1はこの炎症性サイトカインであり、細胞の活性化に関与する。インターロイキン1は $\alpha$ 型及び $\beta$ 型の2種類が知られている。

【0003】現在までにヒトやマウスなどについてはインターロイキン1の構造が決定されている（「シー・ティール・ロメディコ他著、ネーチャー、312巻、458頁、1984年(P.T.Lomedico et al., Nature, Vol.312, p.458(1984))」及び「シー・ジェイ・マーチ他著、ネーチャ

ー、315巻、641頁、1985年(C.J.March et al., Nature, Vol.315, p.641(1985))」。しかしながら、ウマインターロイキン1についての構造は決定されていない。このことは、ウマインターロイキン1と上記の炎症性疾患との関係を研究する上で障害となっており、さらに、ウマインターロイキン1との関係からみた炎症性疾患の診断薬を開発する上で不利となっている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】請求項1記載の発明は、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン1の関係について研究する上で重要なウマインターロイキン1ペプチドを提供するものである。請求項2記載の発明は、請求項1記載の発明の効果に加え、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン1のサブタイプ( $\alpha$ 型)の関係について研究する上で重要な $\alpha$ 型のウマインターロイキン1ペプチドを提供するものである。請求項3記載の発明は、請求項1記載の発明の効果に加え、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン1のサブタイプ( $\beta$ 型)の関係について研究する上で重要な $\beta$ 型のウマインターロイキン1ペプチドを提供するものである。

【0005】請求項4記載の発明は、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン1の関係について研究する上で重要な、ウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNA若しくはそれに相補的なDNAを提供するものである。請求項5記載の発明は、請求項4記載の発明の効果に加え、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン1のサブタイプ( $\alpha$ 型)の関係について研究する上で重要な、 $\alpha$ 型のウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNAを提供するものである。請求項6記載の発明は、請求項4記載の発明の効果に加え、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン1のサブタイプ( $\beta$ 型)の関係について研究する上で重要な、 $\beta$ 型のウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNAを提供するものである。

【0006】請求項7記載の発明は、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン1の関係について研究する上で重要な、ウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNA若しくはそれに相補的なDNAを含む組換えベクターを提供するものである。請求項8記載の発明は、請求項7記載の発明の効果に加え、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン1のサブタイプ( $\alpha$ 型)の関係について研究する上で重要な、 $\alpha$ 型のウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNAを含む組換えベクターを提供するものである。請求項9記載の発明は、請求項7記載の発明の効果に加え、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン1のサブタイプ( $\beta$ 型)の関係について研究する上で重要な、 $\beta$ 型のウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNAを含む組換えベクターを提供するものである。

【0007】請求項10記載の発明は、ウマの炎症性疾

患とウマインターロイキン1の関係について研究する上で重要な、ウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNA若しくはそれに相補的なDNAを含む形質転換体を提供するものである。請求項11記載の発明は、請求項10記載の発明の効果に加え、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン1のサブタイプ( $\alpha$ 型)の関係について研究する上で重要な、 $\alpha$ 型のウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNAを含む形質転換体を提供するものである。請求項12記載の発明は、請求項10記載の発明の効果に加え、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン1のサブタイプ( $\beta$ 型)の関係について研究する上で重要な、 $\beta$ 型のウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNAを含む形質転換体を提供するものである。請求項13記載の発明は、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン1の関係について研究する上で重要な抗ウマインターロイキン1抗体の製造法を提供するものである。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、下記(1)～(13)に関するものである。

(1) 配列番号1又は2で示されるペプチド中の連続した少なくとも5個のアミノ酸からなる配列を含むウマインターロイキン1ペプチド。

(2) 配列番号1で示されるペプチドである、前記

(1)記載のペプチド

(3) 配列番号2で示されるペプチドである、前記

(1)記載のペプチド

(4) 前記(1)～(3)のいずれかに記載のペプチドをコードするDNA若しくはそれに相補的なDNA。

(5) 配列番号3で示される塩基配列を有する、前記

(4)記載のDNA。

(6) 配列番号4で示される塩基配列を有する、前記

(4)記載のDNA。

【0009】(7) 前記(4)～(6)のいずれかに記載のDNAを含む組換えベクター。

(8) プラスミドpCE $\alpha$ である、前記(7)記載の組換えベクター。

(9) プラスミドpE $\beta$ 5である、前記(8)記載の組換えベクター。

(10) 前記(7)～(9)のいずれかに記載の組換えベクターを含む形質転換体。

(11) FERM P-15142として寄託されている前記(10)記載の形質転換体。

(12) FERM P-15143として寄託されている前記(10)記載の形質転換体。

(13) 前記(1)～(3)のいずれかに記載のペプチドを抗原として使用することを特徴とする、抗ウマインターロイキン1抗体の製造法。

#### 【0010】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

#### ウマインターロイキン1

インターロイキン1は、前述したように炎症性サイトカインであり、細胞の活性化に関与し、 $\alpha$ 型及び $\beta$ 型の2種類がある。 $\alpha$ 型のウマインターロイキン1は、配列番号1で示されるペプチドであり、 $\beta$ 型のウマインターロイキン1は、配列番号2で示されるペプチドである。なお、配列表において、アミノ酸配列は、アミノ基末端のアミノ酸を1番としている(以下同様)。

#### 【0011】ウマインターロイキン1ペプチド

本発明におけるウマインターロイキン1ペプチドは、前記ウマインターロイキン1、その一部分、又はウマインターロイキン1若しくはその一部分を含むペプチドの総称である。上記ウマインターロイキン1ペプチドは、ウマインターロイキン1としての抗原性を保有することが必要とされる。

【0012】ウマインターロイキン1ペプチドは、ウマインターロイキン1が抗原性を有する最小の大きさの観点から、配列番号1又は2で示されるペプチド中の連続した少なくとも5個のアミノ酸からなる配列を含むペプチド(以下、ペプチドAという)であることが好ましい。ペプチドAとしては、例えば、配列番号1で示されるペプチドが挙げられ、これは $\alpha$ 型のウマインターロイキン1の全アミノ酸配列である。また、ペプチドAとしては、配列番号2で示されるペプチドも挙げられ、これは $\beta$ 型のウマインターロイキン1の全アミノ酸配列である。これらのペプチドは、ウマインターロイキン1としての抗原性を保有する。

【0013】ウマインターロイキン1ペプチドのペプチド鎖中に含有されるウマインターロイキン1由来のアミノ酸配列が長いほうが高感度の抗原抗体反応を期待することができ、また、高い生物活性(軟骨細胞の破壊能力等)を期待することができることから、ペプチドAとしては、配列番号1で示されるペプチド中の連続した20個以上のアミノ酸からなる配列を含むペプチドであることが好ましく、200個以上のアミノ酸からなる配列を含むペプチドであることがさらに好ましい。このようなペプチドとしては、例えば、前述した配列番号1で示されるペプチド及び配列番号2で示されるペプチドが挙げられる。

【0014】また、ペプチドAとしては、抗原性を高める観点から、配列番号1で示されるペプチド中の連続した少なくとも5個のアミノ酸からなる配列が繰り返された配列を有するペプチドであることが好ましい。繰り返し単位となる配列としては、例えば、前記配列番号1で示されるペプチドのアミノ酸配列、配列番号2で示されるペプチドのアミノ酸配列等が挙げられる。繰り返し回数は特に限定されないが、通常、1～10回とされる。繰り返し単位同士は、直接又は介在物を介して結合する。介在物としては、例えば、アミノ酸配列が挙げられる。前記アミノ酸配列に含まれるアミノ酸の個数は特

に限定されないが、通常、1～50個とされ、前記アミノ酸配列の具体例としては、例えば、アラニン-アラニン-アラニンからなるアミノ酸配列等が挙げられる。

【0015】また、ウマインターロイキン1としての抗原性を保有する限り、ペプチドAは、配列番号1又は2で示されるペプチドからアミノ酸（例えば1～263個）が欠落しているものであってもよい。欠落するアミノ酸の個数が多すぎると、ペプチドAのウマインターロイキン1としての抗原性が損なわれる傾向がある。欠落するアミノ酸の個数が多い場合（例えば5個以上）、ウマインターロイキン1としての抗原性が低下しやすいので、この低下をできるだけ小さくするためには、配列番号1又は2で示されるペプチドから欠落するアミノ酸は連続しているものであることが好ましい。

【0016】さらに、ウマインターロイキン1としての抗原性を保有する限り、ペプチドAとしては、ウマインターロイキン1由来のアミノ酸配列に加えてそれ以外のアミノ酸配列を含有するペプチドを利用することもできるが、このペプチドは、ウマインターロイキン1としての抗原性に対して、ウマインターロイキン1以外の化合物としての抗原性がないか又は低いことが必要とされる。このようなペプチドの例としては、配列番号1又は2で示されるペプチドの中のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されているペプチド、配列番号1又は2で示されるペプチドの中にアミノ酸が挿入されているペプチド、配列番号1又は2で示されるペプチドの中の連続した少なくとも5個のアミノ酸からなる配列に、直接又は介在物を介して、アミノ酸若しくは他のペプチドが結合したペプチド等が挙げられる。

【0017】置換又は挿入されるアミノ酸の個数が多い場合（例えば5個以上）、また、結合する他のペプチドに含まれるアミノ酸の個数が多すぎる場合（例えば1,000個以上）、ウマインターロイキン1としての抗原性が低下しやすいので、この低下をできるだけ小さくするためには、配列番号1又は2で示されるペプチドの中において置換又は挿入されるアミノ酸は連続しているものであることが好ましく、また、結合する他のペプチドは1,000個未満のアミノ酸からなる配列であることが好ましい。

【0018】置換されるアミノ酸は類似の性質を有するものであることが好ましく、例えば、グリシンとアラニンの置換が挙げられる。結合するアミノ酸若しくは他のペプチドとしては、例えば、アラニン、アラニン-アラニン-アラニン、 $\beta$ -カラクチンゲーズ等が挙げられる。介在物としては、前述したものが挙げられる。前記介在物、アミノ酸若しくは他のペプチドは、前記配列番号1又は2で示されるペプチドの中の連続した少なくとも5個のアミノ酸からなる配列のアミノ基末端側とカルボキシル基末端側のいずれに結合してもよい。

【0019】ウマインターロイキン1ペプチドの製造法

本発明におけるウマインターロイキン1ペプチドを製造する方法としては、例えば、化学合成法や遺伝子組換え法が挙げられる。化学合成法としては、例えば、マップ（Multiple Antigen Peptide, MAP）法があり、30個以下のアミノ酸配列からなるペプチドの合成に適しており、市販のペプチド合成機を使用して合成することができる。ペプチドはマップ法により繰り返す形で合成することができる。遺伝子組換え法としては、例えば、本発明のウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNAをベクターに挿入して組換えベクターを構築し、それを宿主に挿入して形質転換体を作製し、その形質転換体から目的のペプチドを精製する方法がある。

【0020】本発明のウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNAについては後述する。ベクターとしては、例えば、プラスミドやファージ等がある。宿主としては、例えば、大腸菌、枯草菌、酵母等がある。以下、形質転換体の作製法と、その形質転換体を用いた目的のペプチドの精製法について詳しく説明する。

【0021】本発明のDNAを含む組換えベクターは、ウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNA（後述）を常法で既存のプラスミドベクターやファージベクター等に挿入して作製することができる。その際、必要に応じ、リンカーを使用する。挿入されたDNAを発現させる場合は、DNAの挿入箇所はプロモーター領域の下流であることが必要とされる。既存のプラスミドベクターとしては、例えばpBR322、pUC18、pUC19、pCER2（インビトロゲン（Invitrogen）社（米国）商品名）、Bluescript SK-（ストラタジーン（Stratagene）社（米国）商品名）等があり、ファージベクターとしては、例えば、 $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11等がある。これらのベクターはいずれも市販されており、用いた親ベクターに対応する組換えベクターが得られる。本発明のDNAを含む組換えベクターとしては、後述するように、pCE $\alpha$ 、pE $\beta$ 5等が挙げられる。

【0022】得られた組換えベクターを宿主に入れ、形質転換体を作製する。大腸菌由来のプラスミドやファージを使用する場合は宿主としては大腸菌を使用することができ、例えば、大腸菌HB101株を使用することができる。宿主は、通常、コンピテントセルとなるように処理されて使用される。大腸菌HB101株を処理して得たコンピテントセルは宝酒造（株）等から販売されている。大腸菌を使用して形質転換体を作製する方法としては、例えば、対数増殖期前半の大腸菌を、氷冷下、20mM程度の塩化カルシウム溶液で洗浄し、大腸菌を前記塩化カルシウム溶液に懸濁し、これに組換えベクターを添加し、42℃、1～2分間保温する方法を採用することができる。

【0023】組換えベクターの作製及び形質転換体の作製は市販のキットを利用しても行うことができ、このようなキットとしては、米国インビトロゲン社のT Aーク

ローニングキット (TA-Cloning Kit) や米国キュアゲン (Qiagen) 社のキュアゲン・プラスミド・キット (Qiagen Plasmid Kit) 等がある。組換えベクターを利用して形質転換体を作製する一般的手法は、「サムブロック他編集、モレキュラー・クローニング 第2版 (コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー) (1989年)

(J. Sambrook et al., Molecular Cloning 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)、以下、本文を文献「モレキュラー・クローニング」という) に記載されている。

【0024】形質転換体を培養する方法としては、例えば、その形質転換体が成長しうる培地でウマインターロイキン1ペプチドが形質転換体内に十分蓄積されるまで適温で培養器を振とうする方法を採用することができる。培地としては、例えば、LB培地、TB培地、2YT培地等を使用することができる。培養温度は、例えば、宿主として大腸菌を使用する場合、37℃～42℃を採用することができる。組換えベクターが抗生物質耐性遺伝子を発現しているものであれば、組換えベクターを保有しない形質転換体の増殖を抑制する点から、培地にその抗生物質を添加しておくことが好ましい。このような抗生物質としては、例えば、アンピシリンがある。培養時間は、宿主の種類、培養装置、培養温度、培養開始時における培養液中の形質転換体の濃度等によって異なるが、LB培地を用いて37℃で振とう培養する場合、通常、一晩である。LB培地、TB培地、2YT培地等の調製方法や培養方法の一般的手法は、文献「モレキュラー・クローニング」に記載されている。

【0025】培養した形質転換体を破碎する方法としては、例えば、遠心分離で形質転換体を集め、これを緩衝液に懸濁して懸濁液を作製し、この懸濁液に物理的な衝撃を与える方法を採用することができる。緩衝液としては、例えば、TE緩衝液を使用することができる。上記懸濁液に物理的な衝撃を与える方法としては、例えば、上記懸濁液に超音波を照射する方法を使用することができる。形質転換体が大腸菌の場合は、上記懸濁液に物理的な衝撃を与える代わりに、例えば、上記懸濁液にリゾチームを加え、ドテシル硫酸ナトリウム (SDS) を含むTE緩衝液を加えて攪拌することによって形質転換体を溶解させる方法を採用することもできる。形質転換体を破碎又は溶解した後、遠心分離して細胞残渣を除去し、上清を取得する。

【0026】なお、目的のペプチドが、そのアミノ末端側にシグナルペプチドが結合した融合タンパク質となっている (すなわち、目的のペプチドを細胞外に分泌させることが可能である) 場合は、培養液を遠心分離して上清を取得する方法を使用することができる。

【0027】ペプチドの精製法としては、例えば、ストレプトマイシン硫酸塩を添加する核酸の除去及び硫酸アンモニウムを添加する蛋白質の取得の各工程を使用する

ことができる。ストレプトマイシン硫酸塩を添加して核酸を除去する工程としては、例えば、上記のいずれかの上清にストレプトマイシン硫酸塩を添加し、しばらく攪拌し、遠心分離することによって、核酸を沈殿物として除去し、上清を取得する操作を使用することができる。硫酸アンモニウムを添加して蛋白質を取得する工程としては、例えば、核酸を沈殿物として除去した後の上清に硫酸アンモニウムを添加し、攪拌し、遠心分離する操作を使用することができる。通常、沈殿を取得するが、目的のペプチドが上清に含まれていることもあり、サンプリングして、目的のペプチドの有無を確認しておくことが好ましい。

【0028】続いて、ウマインターロイキン1ペプチドを含む画分を取得する工程を行う。この工程としては、例えば、上記沈殿を少量の緩衝液に溶解したものか又は上記上清を液体クロマトグラフィーによって分画し、ウマインターロイキン1ペプチドが含有されている画分を同定する方法を使用することができる。ウマインターロイキン1ペプチドが含有されている画分を同定するためには、例えば、分子量を指標とした電気泳動や、軟骨細胞の破壊能力等の生物活性を指標としたバイオアッセイを利用することができる。ウマインターロイキン1ペプチドの分子量は、そのアミノ酸配列から求めることができる。細胞膜等の残渣の除去、ストレプトマイシン硫酸塩を添加する核酸の除去及び硫酸アンモニウムを添加する蛋白質の取得の具体的方法は、文献「モレキュラー・クローニング」に記載されている。

【0029】なお、形質転換体に含有されているベクターが、挿入されたDNAにコードされているペプチドを他のペプチドとの融合タンパク質として産生できるものである場合は、この「他のペプチド」の性質を利用することによってウマインターロイキン1ペプチドを精製することができる。

【0030】ウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNA

本発明において、ウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNAとは、ペプチドAをコードするDNAであり、このDNAは、ペプチドAのアミノ酸配列をトリプレット暗号表に従ってアミノ酸をスクレオチド配列に読み替えたときのDNA群から選ばれるDNAのことである。本発明において、配列番号1又は2で示されるペプチドをコードするDNAとは、配列番号1又は2で示されるペプチドをトリプレット暗号表 (それぞれのアミノ酸に対して、1～6通りのスクレオチド配列が割り当てられている) に従ってアミノ酸をスクレオチド配列に読み替えたときのDNA群 (この中には、それぞれ、配列番号3又は4で示される塩基配列を有するDNAも含まれる) から選ばれるDNAのことである。

【0031】ペプチドAとしては、前記ウマインターロイキン1ペプチドの項で説明したものが挙げられ、ペプ

チドAをコードするDNAも、これらのペプチドのアミノ酸配列に対応したスクレオチド配列のものが挙げられる。なお、配列表において、塩基配列は、5'末端の塩基を1番としている(以下同様)。

【0032】ペプチドAをコードするDNAは、化学合成法か遺伝子組換え法で作製することかできる。化学合成法としては、例えば、ホスホアミダイト法があり、全長が100塩基以下の塩基配列からなるDNAの合成に適しており、市販のDNA合成機で化学合成することができる。全長が100塩基よりも長いDNAを作製するためには、後述の遺伝子組換え法を利用することもできるが、次のようにしても作製することができる。即ち、塩基配列を100個未満の塩基に区切り、それぞれの塩基配列からなるDNA断片を上記のように化学合成し、これらのDNA断片を混合し、T4-DNAリガーゼを用いてこれらのDNA断片を連結する。その際、相補鎖のDNA断片も合成し、DNA断片同士を対合させたときに突出末端が生じるようにすると、突出末端が粘着末端の役割を果たし、目的のDNAが得られやすい。

【0033】遺伝子組換え法としては、例えば、後述するようにウマの末梢単核球(PBMC)を用いて相補的DNA(cDNA)を作製し、他の生物種のインターロイキン1の遺伝子で保存されている塩基配列を元にして作製したプライマーを利用してウマインターロイキン1ペプチドをコードするcDNAを増幅させて取得する方法が挙げられる。遺伝子組換え法は100塩基以上の長いDNAの作製も可能である。DNAの塩基配列は常法に従って決定することができる。塩基配列の決定方法としては、例えば、ジデオキシターミネーション法があり、市販のキットを使用することができる。このようなキットはスウェーデンのファルマシア(Pharmacia)社等から販売されている。

【0034】次に、ウマのPBMCからウマインターロイキン1ペプチドをコードするcDNAを取得する方法について詳しく説明する。まず、馬(サラブレッド種等)から血液(末梢血等)を取得し、遠心分離等によりPBMC画分を取得し、この画分を培養する。培養方法としては、例えば、炭酸ガス存在下(例えば、5%(v/v))、ウシ胎児血清、ゲンタマイシン及びリボポリサッカライドを含む動物細胞培養用培地中でPBMC画分を適温(例えば、37℃)で24時間保温する方法を利用することかできる。動物細胞培養用培地としては、例えば、RPMI 1640培地(日水製薬(株)商品名)を使用することができる。

【0035】続いて遠心分離等によりPBMC細胞を集め、これを溶解し、細胞抽出液を取得する。細胞を溶解して細胞抽出液を取得する方法は、例えば、液体窒素中で細胞を凍結し、これを溶解緩衝液に懸濁し、保温する方法を使用することができる。溶解緩衝液としては、例えば、プロテインースK(20μg/ml)、エチレンジア

ミン四酢酸(EDTA、1mM)及びドデシル硫酸ナトリウム(SDS、0.5%)を含有するトリス-塩酸(10mM、pH7.4)が挙げられる。

【0036】ポリデオキシチミジル酸等を用い、得られた細胞抽出液からポリアデニル酸結合RNA(以下、Poly(A)+RNAと略す)を取得する。細胞からPoly(A)+RNAを取得する一般的手法は、文献“モレキュラー・クローニング”に記載されているが、インビトロゲン社等から販売されているキットを利用することもできる。常法に従い、取得されたPoly(A)+RNAからcDNAを調製する。cDNAの調製の一般的手法は、文献“モレキュラー・クローニング”に記載されているが、ファルマシア社から販売されているキットを利用することもできる。

【0037】次に、他の生物種のインターロイキン1の遺伝子で保存されている塩基配列を元にして作製したプライマーを利用し、ウマインターロイキン1ペプチドをコードするcDNAを増幅させて取得する方法を説明する。cDNAを増幅させる方法としては、例えば、取得されたcDNAに、プライマー・ポリメラーゼ(タカポリメラーゼ等)及びデオキシリボスクレオチド類を添加し、加熱、冷却、保温の工程を繰返す方法が挙げられる。プライマーとしては、ヒト及びマウスのインターロイキン1遺伝子の間でよく保存されている塩基配列(「シー・ディー・ロムディコ他著、ノーチャー、312巻、458頁、1984年(P.T.Lomedico et al., Nature, Vol.312, p.458(1984))」及び「シー・ジェイ・マーチ他著、ノーチャー、315巻、641頁、1985年(C.J.March et al., Nature, Vol.315, p.641(1985))」)又はそれに相補的な塩基配列を有するDNA断片を利用することができる。このようなDNAとしては、例えば、配列番号5～8の塩基配列を有するDNA断片が挙げられる。

【0038】配列番号5の塩基配列は、ヒト及びマウスのインターロイキン1α遺伝子の塩基配列のうち、ペプチドのコード領域の上流側に位置する塩基配列であり、配列番号6の塩基配列は、このコード領域の下流側に位置する塩基配列に相補的な塩基配列である。従って、増幅されるcDNAはウマインターロイキン1αペプチドの全コード領域を含有するものと予測される。一方、配列番号7及び8の塩基配列は、それぞれ、ヒトとマウスのインターロイキン1β遺伝子においてよく保存されている塩基配列及びそれに相補的な塩基配列である。但し、これらの塩基配列の位置関係から判断して、増幅されるcDNAはウマインターロイキン1βペプチドの全コード領域を含有するものではなく、その一部分であると予測される。このDNA増幅方法の一般的手法は、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション(Polymerase Chain Reaction: PCR)法として知られており、その詳細は文献“モレキュラー・クローニング”に記載されている。

【0039】なお、取得したcDNAがウマインターロイキン1ペプチドの全コード領域を含有するものではない場合は、さらにゲノムウォーキング等を行い、全コード領域を含むDNAを取得することができる。ゲノムウォーキングには市販のキットを利用することもできる。

【0040】一旦、ウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNAが取得されると、遺伝子組換え法や前述したPCR法を利用することによって、そのDNAを複製させることができるので、ウマPBMCからウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNAを再度取得する操作は不要である。

【0041】遺伝子組換え法を用いる方法は、例えば、次のようにして行うことができる。まず、取得されたウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNAを上述したように既存のプラスミドベクターやファージベクター等に挿入して組換えベクターを作製し、その組換えベクターを宿主に入れて形質転換体を作製し、その形質転換体を培養する。この培養により形質転換体内で組換えベクターが増幅されるので、その形質転換体から増幅された組換えベクターを取得し、制限酵素を用いてウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNAを切り出す。形質転換体から増幅された組換えベクターを取得する操作は、例えば、次のようにして行うことができる。組換えベクターがプラスミドである場合、その形質転換体を破碎し、フェノール、クロロホルム処理とエタノール沈殿処理を行い、DNAを取得する。臭化エチジウム含有塩化セシウムを用い、取得したDNAを超遠心分離し、組換えベクターをプラスミドDNAとして取得する。一方、組換えベクターがファージである場合、その形質転換体を破碎し、ファージ粒子を取得し、ファージ粒子を溶解し、組換えベクターをファージDNAとして取得する。

【0042】PCR法を利用する方法としては、例えば、増幅させようとするDNAの両末端の塩基配列を基にして化学合成法によりプライマーDNAを作製し、ウマインターロイキン1ペプチドをコードするDNAを鋳型DNAとしてPCR法を行う方法を使用することができる。遺伝子組換え法やPCR法を用いてDNAを複製させる方法の一般的手法は文献「モレキュラー・クローニング」に記載されている。

【0043】抗ウマインターロイキン1抗体の製造法本発明に係る抗ウマインターロイキン1抗体は、例えば、本発明のウマインターロイキン1ペプチドを抗原として得られる、抗血清及び単離された抗ウマインターロイキン1抗体として得ることができる。抗血清を製造する方法としては、例えば、本発明のウマインターロイキン1ペプチドを抗原としてウサギやマウス等の動物を免疫し、その血清を取得する方法が使用できる。また、抗ウマインターロイキン1抗体を単離製造する方法としては、例えば、本発明のウマインターロイキン1ペプチド

を抗原としてウサギやマウスを免疫し、その脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合させてハイブリドーマを作製し、その中から前述したウマインターロイキン1ペプチドを認識するハイブリドーマを選択し、これを培養し、その培養上清を取得する方法が使用できる。抗原性を高めるため、必要に応じ、本発明のウマインターロイキン1ペプチドに適当なキャリアタンパク質を結合させて免疫原としてもよい。

【0044】免疫時に使用するアジュバントは種々のものが利用できるが、フロイントの完全アジュバント(FCA)やフロイントの不完全アジュバント(FIA)が好ましい。骨髓腫細胞としては、例えば、P3X63Ag8.653(ATCC(American Type Culture Collection) CRL-1580)やP3JNS1-1-Ag4-1(ATCC TIB-18)を使用することができる。抗原を免疫する動物としては、ウサギ、マウス、ラット、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等が使用できるが、ここに例示された動物種に限定されるものではない。抗原として本発明のウマインターロイキン1ペプチドを使用すること以外は、動物を免疫して抗体を得る公知の一般的手法に従い、抗ウマインターロイキン1抗体を製造することができる。抗体としてはポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体がある。

【0045】なお、これらの抗血清や単離製造された抗ウマインターロイキン1抗体は、各種酵素、コロイド等で修飾されてもよい。得られた抗血清や単離製造された抗ウマインターロイキン1抗体は、血中、体液、尿中などのウマインターロイキン1の濃度を測定するのに使用でき、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン1の関係を研究する上での研究用試薬として利用できるだけでなく、ウマの健康状態や炎症性疾患等の診断への応用が期待できる。

【0046】

【実施例】以下、実施例により本発明を詳細に説明する。

実施例1 ウマ末梢血単核球(PBMC)のcDNAの調製

健康サラブレッドの末梢血をフィコール-ハイパック(Ficoll-Hypaque)(リンフォプレップ(Lymphoprep)社(ノルウェー)商品名)に重層し、これを遠心分離することにより末梢血単核球画分を得た。末梢血単核球画分を10%ウシ胎児血清、ゲンタマイシン(50μg/ml)、リボポリサッカライド(5μg/ml)を含むRPMI1640培地(日水製薬(株)商品名)に1×10<sup>6</sup>個/ml濃度となるように懸濁し、5%(v/v)炭酸ガス存在下、この懸濁液を37℃で保温した。24時間後、遠心分離により細胞を集め、これを液体窒素で凍結した。ファースト・トラック・エム・アール・エス・単離キット(Fast Track mRNA Isolation Kit)(インビトロゲン社商品名)を用い、液体窒素で凍結した細胞からP



oly (A) + RNAを抽出した。cDNA合成キット（ファルマシア社（スウェーデン）製）を用い、Poly (A) + RNAからcDNAを合成した。

#### 【0047】実施例2 ウマインターロイキン-1 $\alpha$ のcDNAの取得

PCR法を用いてウマインターロイキン-1 $\alpha$ のコード領域全体を取得するため、PCR法に使用するプライマーの塩基配列としては、ヒト及びマウスのインターロイキン-1 $\alpha$ 遺伝子でよく保存されている塩基配列の中で、5'プライマのコード領域の上流側に位置する塩基配列（配列番号5で示される塩基配列）とこのコード領域の下流側に位置する塩基配列に相補的な塩基配列（配列番号6で示される塩基配列）を利用した。

【0048】配列番号5及び6で示される塩基配列のDNAをDNA合成機で化学合成してこれらをプライマーとした。実施例1で作製したcDNAにこれらのプライマー各0.4mM、フックホリメラゼ1、5ユニット及びデオキシリボヌクレオチド類を加えて100 $\mu$ lとし、PCR法による増幅を行った。増幅操作としては、加熱（94℃、1分）による変性、冷却（37℃、1分）によるアニーリング、及び保温（72℃、1分）によるポリメライゼーション、の各工程のサイクルを30回繰り返した。増幅操作後、反応液を臭化エチリウム含有2%アガロースゲル電気泳動にかけ、反応液中のDNAを分子量の差で分離し（分子量が小さいほど、泳動距離が長い）、増幅されたcDNAを取得した。取得したcDNAに制限酵素EcoRIのリンカーを連結し、TA-クローニングキット（TA-Cloning Kit）（インビトロケン社商品名）を用い、リンカーが結合したcDNAをこのキットに付属されているプラスミドpCR2と連結し、連結混合物を得た。大腸菌（DH5 $\alpha$ （BRL社（米国）商品名））を宿主とし、この大腸菌の懸濁液と上記連結混合物を混合した。この混合液をアンピシリン（50mg/ml）、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトシド（36mg/ml）およびイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトシド（40mg/ml）を含む2 $\times$ TYアガープレートに播種し、培養した。さらに、キュアゲン・プラスミド・キット（キュアゲン社商品名）を用い、cDNAの挿入のある組換えバクターが含有されている大腸菌を白色のコロニーとして選別し、コロニーを取得し、コロニー中の大腸菌からウマインターロイキン-1 $\alpha$ のcDNAが挿入された組換えプラスミドバクターを得た。得られた組換えプラスミドバクターをpCE $\alpha$ と命名した。

#### 【0049】実施例3 ウマインターロイキン-1 $\alpha$ のcDNAの塩基配列解析

キョー・シーケンシング・デリベーション・キット（宝酒造（株）商品名）、エクソヌクレアーゼI II及びミングビーンヌクレアーゼを用い、実施例2で取得したプラスミドからデリベーションミュータントを調製した。オート-

リード・シーケンシング・キット（ファルマシア社商品名）を用い、ジデオキシターミネーション法に従い、プラスミド中に挿入されたウマインターロイキン-1 $\alpha$ のcDNAの塩基配列を決定した。その結果、取得されたウマインターロイキン-1 $\alpha$ のcDNAは配列番号3の塩基配列を有していた。この塩基配列を解析した結果、配列番号3の塩基配列は配列番号1のアミノ酸配列をコードしていることがわかった。

#### 【0050】実施例4 ウマインターロイキン-1 $\beta$ のcDNAの取得

PCR法を用いてウマインターロイキン-1 $\beta$ のコード領域を取得するため、PCR法に使用するプライマーの塩基配列としては、ヒト及びマウスのインターロイキン-1 $\beta$ 遺伝子でよく保存されている塩基配列の中で比較的上流に位置する塩基配列（配列番号7で示される塩基配列）と比較的下流に位置する塩基配列に相補的な塩基配列（配列番号8で示される塩基配列）を利用した。配列番号7及び8で示される塩基配列のDNAをDNA合成機で化学合成してこれらをプライマーとした。

【0051】プライマーとして配列番号7の塩基配列のDNA及び配列番号8の塩基配列のDNAを使用する以外は、実施例2記載の操作に従い、cDNAを増幅した。しかし、増幅されたcDNAは、使用されたプライマーの塩基配列から判断して、ウマインターロイキン-1 $\beta$ の全コード領域を含有してはいないと思われたので、以下のように、この全コード領域を取得する操作をした。即ち、実施例1で得たcDNAに制限酵素EcoRIのリンカーを連結し、予めEcoRIで消化されたファージベクターラムダ・ザッパ-11と連結し、ギガパック・プラス（Gigapack Plus）（ストラタジーン（Stratagene）社（米国）商品名）を用いてファージの殻に封入した。これをNZYプレートに播種し、培養した。得られたフラクをナイロンメンブレンフィルター「ハイボンド-N」（Hybond-N）（アマシャム・インターナショナル（Amersham International）社（英国）商品名）に移し取った。

【0052】一方、前述の増幅されたcDNAを $\alpha$ -32Pで標識し、プローブとした。50%ホルムアミド、1%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、5%アイリッシュクリーム（Irish Cream）、4 $\times$ SSPE（ここで、1 $\times$ SSPEは、0.18M NaCl、0.01M リン酸ナトリウム及び1mM エチレンジアミン四酢酸（EDTA））を含有する水溶液である）及び100mg/ml 変性サケ精子DNAを含む溶液に前記プローブを添加し、これに前記フィルターを浸し、37℃で18時間保温することによってハイブリダイゼーションをした。フィルターを4 $\times$ SSC（ここで、1 $\times$ SSCは、0.15M NaCl及び0.015M クエン酸を含有する水溶液である）並びに0.1% SDSを含有する水溶液を用いて37℃、3時間洗浄し、-70℃でオートラジ-

オグラフィーをした。ポジティブシグナルを出すフェージを選択し、これにR408ヘルパーフェージ(ストラクジーン社(米国)商品名)を添加することにより、ポジティブシグナルを出すフェージの挿入部分がプラスミドベクター「ピーブルースクリフト」(pBluescript)に挿入された組換えプラスミドベクター、即ち、ウマインターロイキン-1βのcDNAを含む組換えプラスミドベクターを得た。得られた組換えプラスミドベクターをpE6αと命名した。

【0053】実施例5 ウマインターロイキン-1βのcDNAの塩基配列解析

実施例3と同様にし、プラスミド中に挿入されたウマインターロイキン-1βのcDNAの塩基配列を決定した。その結果、ウマインターロイキン-1βのcDNAは配列番号4の塩基配列を有していた。この塩基配列を解析した結果、配列番号4の塩基配列は配列番号2のアミノ酸配列をコードしていることがわかった。

【0054】実施例6 宿主を変えた形質転換体の作製 実施例2で得たプラスミドpCEα及び実施例4で得たプラスミドpEβ5を、それぞれ、大腸菌JM109株に挿入し、宿主を変えた形質転換体を作製した。得られた形質転換体は、受託番号FERM-P-15142及びFERM-P-15143として、それぞれ、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【0055】

【発明の効果】請求項1記載のペプチドは、ウマの炎症性疾患とウマのインターロイキン-1の関係について研究する上で重要であり、この研究用の試薬の主要成分として有用である。請求項2記載のペプチドは、請求項1記載のペプチドの効果を奏し、さらに、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン-1のサブタイプ(α型)の関係について研究する上で重要であり、この研究用の試薬の主要成分として有用である。請求項3記載のペプチドは、請求項1記載のペプチドの効果を奏し、さらに、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン-1のサブタイプ(β型)の関係について研究する上で重要であり、この研究用の試薬の主要成分として有用である。

【0056】請求項4記載のDNAは、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン-1の関係について研究する上で重要であり、この研究用の試薬の主要成分として有用である。請求項5記載のDNAは、請求項4記載のDNAの効果を奏し、さらに、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン-1のサブタイプ(α型)の関係について研究する上で重要であり、この研究用の試薬の主要成分と

して有用である。請求項6記載のDNAは、請求項4記載のDNAの効果を奏し、さらに、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン-1のサブタイプ(β型)の関係について研究する上で重要であり、この研究用の試薬の主要成分として有用である。

【0057】請求項7記載の組換えベクターは、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン-1の関係について研究する上で重要であり、ウマインターロイキン-1ペプチドの製造に利用することができる。請求項8記載の組換えベクターは、請求項7記載の組換えベクターの効果を奏し、さらに、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン-1のサブタイプ(α型)の関係について研究する上で重要であり、ウマインターロイキン-1αペプチドの製造に利用することができる。請求項9記載の組換えベクターは、請求項7記載の組換えベクターの効果を奏し、さらに、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン-1のサブタイプ(β型)の関係について研究する上で重要であり、ウマインターロイキン-1βペプチドの製造に利用することができる。

【0058】請求項10記載の形質転換体は、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン-1の関係について研究する上で重要であり、ウマインターロイキン-1ペプチドの製造に利用することができる。請求項11記載の形質転換体は、請求項10記載の形質転換体の効果を奏し、さらに、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン-1のサブタイプ(α型)の関係について研究する上で重要であり、ウマインターロイキン-1αペプチドの製造に利用することができる。請求項12記載の形質転換体は、請求項10記載の形質転換体の効果を奏し、さらに、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン-1のサブタイプ(β型)の関係について研究する上で重要であり、ウマインターロイキン-1βペプチドの製造に利用することができる。請求項13記載の抗体の製造法は、ウマの炎症性疾患とウマインターロイキン-1の関係について研究する上で重要であり、この研究用の試薬の主要成分として有用な抗ウマインターロイキン-1抗体の製造に好適である。

【0059】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 270

配列の型: アミノ酸

配列の種類: ペプチド

配列

Met Ala Lys Val Pro Asp Leu Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser

1

5

10

15

Glu Asn Glu Asp Tyr Ser Ser Glu Ile Asp His Leu Ser Leu Thr Gin

20

25

30

Lys Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Tyr Asp Pro Leu Pro Glu Asp Cys Met

35	40	45
Asp Thr Phe Met Ser Leu Ser Thr Ser Glu Thr Ser Lys Thr Ser Lys		
50	55	60
Leu Asn Phe Lys Glu Ser Val Val Leu Val Ala Ala Asn Gly Lys Thr		
65	70	75
Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Asn Gln Phe Ile Thr Asn Asp Asp		80
85	90	95
Leu Glu Ala Ile Ala Asn Asp Pro Glu Glu Gly Ile Ile Arg Pro Arg		
100	105	110
Ser Val His Tyr Asn Phe Gln Ser Asn Thr Lys Tyr Asn Phe Met Arg		
115	120	125
Ile Val Asn His Gln Cys Thr Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Val		
130	135	140
Ile Arg Asp Thr Ser Gly Gln Tyr Leu Ala Thr Ala Ala Leu Asn Asn		
145	150	155
Leu Asp Asp Ala Val Lys Phe Asp Met Gly Ala Tyr Thr Ser Glu Glu		
165	170	175
Asp Ser Gln Leu Pro Val Thr Leu Arg Ile Ser Lys Thr Arg Leu Phe		
180	185	190
Val Ser Ala Gln Asn Glu Asp Glu Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro		
195	200	205
Asp Thr Pro Lys Thr Ile Lys Asp Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp		
210	215	220
Glu Arg His Gly Ser Lys Asn Tyr Phe Lys Ser Val Ala His Pro Lys		
225	230	235
Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Gly Lys Leu Val His Met Ala Arg Gly		
245	250	255
Gln Pro Ser Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Asp Asn Gln Phe		
260	265	270

【0060】配列番号：2

配列の長さ：268

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ala Ala Val Pro Asp Thr Ser Asp Met Met Thr Tyr Cys Ser Gly		
1	5	10
Asn Glu Asn Asp Leu Phe Phe Glu Glu Asp Gly Pro Lys Gln Met Lys		
20	25	30
Gly Ser Phe Gln Asp Leu Asp Leu Ser Ser Met Gly Asp Gly Gly Ile		
35	40	45
Gln Leu Gln Phe Ser His His Leu Tyr Asn Lys Thr Phe Lys His Ala		
50	55	60
Met Ser Ile Ile Val Ala Val Glu Lys Leu Lys Lys Ile Pro Val Pro		
65	70	75
Cys Ser Gln Ala Phe Gln Asp Asp Asp Leu Arg Ser Leu Phe Ser Val		
85	90	95
Ile Phe Glu Glu Glu Pro Ile Ile Cys Asp Asn Trp Asp Glu Gly Tyr		
100	105	110
Val Cys Asp Ala Ala Met His Ser Val Asn Cys Arg Leu Arg Asp Ile		
115	120	125
Tyr His Lys Ser Leu Val Leu Ser Gly Ala Cys Glu Leu Gln Ala Val		
130	135	140

His Leu Asn Gly Glu Asn Thr Asn Gln Gln Val Val Phe Cys Met Ser  
 145 150 155 160  
 Phe Val Gln Gly Glu Glu Glu Thr Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly  
 165 170 175  
 Leu Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Gly Met Lys Asp Gly Lys  
 180 185 190  
 Pro Thr Leu Gln Leu Glu Thr Val Asp Pro Asn Thr Tyr Pro Lys Arg  
 195 200 205  
 Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Met Glu Ile Lys Gly Asn  
 210 215 220  
 Val Glu Phe Glu Ser Ala Met Tyr Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser  
 225 230 235 240  
 Gln Ala Glu Lys Ser Pro Val Phe Leu Gly Asn Thr Arg Gly Gly Arg  
 245 250 255  
 Asp Ile Thr Asp Phe Ile Met Glu Ile Thr Ser Ala  
 260 265 268

【 0 0 6 1 】 配列番号 : 3

鎖の数 : 二本鎖

配列の長さ : 810

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列の型 : 核酸

## 配列

ATG GCG AAA GTC CCT GAC CTC TTT GAA GAC CTG AAG AAC TGT TAC AGT 48  
 Met Ala Lys Val Pro Asp Leu Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser  
 1 5 10 15  
 GAA AAT GAA GAC TAC AGT TCT GAA ATT GAC CAT CTC TCT CTG ACT CAG 96  
 Glu Asn Glu Asp Tyr Ser Ser Glu Ile Asp His Leu Ser Leu Thr Gln  
 20 25 30  
 AAA TCC TTC TAT GAT GCA AGC TAT GAC CCA CTT CCT GAG GAC TGC ATG 144  
 Lys Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Tyr Asp Pro Leu Pro Glu Asp Cys Met  
 35 40 45  
 GAT ACA TTT ATG TCT CTG AGC ACC TCT GAA ACC TCT AAG ACA TCC AAG 192  
 Asp Thr Phe Met Ser Leu Ser Thr Ser Glu Thr Ser Lys Thr Ser Lys  
 50 55 60  
 CTG AAC TTC AAG GAG AGC GTG GTG CTG GTG GCA GCC AAC GGG AAG ACT 240  
 Leu Asn Phe Lys Glu Ser Val Val Leu Val Ala Ala Asn Gly Lys Thr  
 65 70 75 80  
 CTG AAG AAG AGA CGG TTG AGT TTA AAT CAG TTC ATC ACC AAT GAT GAC 288  
 Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Asn Gln Phe Ile Thr Asn Asp Asp  
 85 90 95  
 CTG GAA GCC ATT GCC AAT GAT CCA GAA GAA GGA ATC ATC AGG CCC CGA 336  
 Leu Glu Ala Ile Ala Asn Asp Pro Glu Glu Gly Ile Ile Arg Pro Arg  
 100 105 110  
 TCA GTA CAT TAC AAC TTC CAG AGC AAT ACA AAA TAC AAC TTT ATG AGG 384  
 Ser Val His Tyr Asn Phe Gln Ser Asn Thr Lys Tyr Asn Phe Met Arg  
 115 120 125  
 ATC GTC AAC CAC CAG TGT ACT CTG AAT GAT GCC CTC AAT CAA AGT GTA 432  
 Ile Val Asn His Gln Cys Thr Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Val  
 130 135 140  
 ATT CGA GAC ACA TCA GGT CAA TAT CTT GCG ACT GCT GCA TTA AAT AAT 480  
 Ile Arg Asp Thr Ser Gly Gln Tyr Leu Ala Thr Ala Ala Leu Asn Asn  
 145 150 155 160

CTG GAC GAC GCA GTG AAA TTT GAC ATG GGT GCT TAT ACA TCA GAA GAG	528
Leu Asp Asp Ala Val Lys Phe Asp Met Gly Ala Tyr Thr Ser Glu Glu	
165 170 175	
GAT TCT CAA CTT CCT GTG ACT CTA AGA ATC TCA AAA ACT CGA CTG TTT	576
Asp Ser Gln Leu Pro Val Thr Leu Arg Ile Ser Lys Thr Arg Leu Phe	
180 185 190	
GTG AGT GCC CAA AAT GAA GAT GAA CCC GTA CTG CTA AAG GAG ATG CCT	624
Val Ser Ala Gln Asn Glu Asp Glu Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro	
195 200 205	
GAC ACA CCC AAA ACT ATC AAA GAT GAG ACC AAC CTC CTC TTC TTC TGG	672
Asp Thr Pro Lys Thr Ile Lys Asp Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp	
210 215 220	
GAA CGT CAC GGC TCT AAG AAC TAC TTC AAA TCG GTT GCC CAT CCA AAG	720
Glu Arg His Gly Ser Lys Asn Tyr Phe Lys Ser Val Ala His Pro Lys	
225 230 235 240	
TTG TTT ATT GCC ACA AAG CAG GGA AAA CTG GTG CAC ATG GCA AGG GGG	768
Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Gly Lys Leu Val His Met Ala Arg Gly	
245 250 255	
CAA CCC TCT ATC ACT GAC TTT CAG ATA TTG GAC AAC CAG TTT	810
Gln Pro Ser Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Asp Asn Gln Phe	
260 265 270	

【0062】配列番号：4

鎖の数：二本鎖

配列の長さ：804

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の型：核酸

## 配列

ATG GCA GCA GTA CCC GAC ACC AGT GAC ATG ATG ACT TAC TGC AGC GGC	48
Met Ala Ala Val Pro Asp Thr Ser Asp Met Met Thr Tyr Cys Ser Gly	
1 5 10 15	
AAT GAG AAT GAC CTG TTC TTT GAG GAG GAT GGC CCA AAA CAG ATG AAG	96
Asn Glu Asn Asp Leu Phe Phe Glu Glu Asp Gly Pro Lys Gln Met Lys	
20 25 30	
GGC AGC TTC CAA GAC CTG GAC CTC AGC TCC ATG GGC GAT GGG GGC ATC	144
Gly Ser Phe Gln Asp Leu Asp Leu Ser Ser Met Gly Asp Gly Gly Ile	
35 40 45	
CAG CTT CAA TTC TCC CAC CAC CTC TAC AAC AAG ACT TTC AAA CAT GCC	192
Gln Leu Gln Phe Ser His His Leu Tyr Asn Lys Thr Phe Lys His Ala	
50 55 60	
ATG TCA ATC ATT GTG GCT GTG GAG AAG CTG AAG AAG ATA CCC GTT CCC	240
Met Ser Ile Ile Val Ala Val Glu Lys Leu Lys Lys Ile Pro Val Pro	
65 70 75 80	
TGC TCA CAG GCC TTC CAG GAT GAT GAC TTG AGG AGC CTC TTT TCT GTC	288
Cys Ser Gln Ala Phe Gln Asp Asp Asp Leu Arg Ser Leu Phe Ser Val	
85 90 95	
ATC TTT GAA GAA GAA CCC ATC ATC TGT GAC AAC TGG GAT GAA GGT TAT	336
Ile Phe Glu Glu Glu Pro Ile Ile Cys Asp Asn Trp Asp Glu Gly Tyr	
100 105 110	
GTA TGT GAT GCA GCC ATG CAT TCA GTG AAC TGC AGA CTC CGG GAC ATA	384
Val Cys Asp Ala Ala Met His Ser Val Asn Cys Arg Leu Arg Asp Ile	
115 120 125	
TAC CAT AAA TCC CTG GTG CTG TCC GGT GCA TGT GAG CTG CAG GCT GTC	432

Tyr His Lys Ser Leu Val	Leu Ser Gly Ala Cys Glu Leu Gln Ala Val	
130	135	140
CAC CTC AAT GGA GAG AAT	ACA AAC CAA CAA GTG GTG TTC TGC ATG AGC	480
His Leu Asn Gly Glu Asn Thr	Asn Gln Gln Val Val Phe Cys Met Ser	
145	150	155
TTT GTG CAA GGA GAA GAA GAG ACT	GAC AAG ATA CCT GTG GCC TTG GGC	528
Phe Val Gln Gly Glu Glu Glu Thr	Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly	
165	170	175
CTC AAG GAA AAG AAC CTG TAC CTG TCT TGT GGG ATG AAA GAT GGG AAG		576
Leu Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser	Cys Gly Met Lys Asp Gly Lys	
180	185	190
CCC ACC CTA CAG CTG GAG ACA GTA GAC CCC AAT ACT TAC CCA AAG AGG		624
Pro Thr Leu Gln Leu Glu Thr Val	Asp Pro Asn Thr Tyr Pro Lys Arg	
195	200	205
AAA ATG GAA AAG CGA TTT GTC TTC AAC AAG ATG GAA ATC AAG GGC AAC		672
Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Met	Glu Ile Lys Gly Asn	
210	215	220
GTG GAA TTT GAG TCT GCA ATG TAC CCC AAC TGG TAC ATC AGT ACC TCT		720
Val Glu Phe Glu Ser Ala Met Tyr Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser		
225	230	235
CAA GCA GAA AAA AGC CCT GTC TTC CTA GGA AAT ACC AGA GGC GGC CGG		768
Gln Ala Glu Lys Ser Pro Val Phe Leu Gly Asn Thr Arg Gly Gly Arg		
245	250	255
GAC ATA ACT GAC TTC ATC ATG GAA ATC ACC TCT GCC		804
Asp Ile Thr Asp Phe Ile Met Glu Ile Thr Ser Ala		
260	265	268

【0063】配列番号:5

配列の長さ:21

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

TCATTGGCGT TTGAGTCAGC A

21

【0064】配列番号:6

配列の長さ:22

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

GTAAACATTC ATTTAGAATT AC

22

【0065】配列番号:7

配列の長さ:24

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

ATGAGGATGA CTTGTTCTTT GAAG

24

【0066】配列番号:8

配列の長さ:22

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

GAGGTGCTGA TGTACCAGTT GG

22

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
// A 6 1 K 38/00	A B B		A 6 1 K 37/02	A B B
(C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 1 2 R 1:91)				
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:19)				

(72)発明者 高木 茂美  
 東京都町田市成瀬5092-3 エステ・スク  
 エア成瀬番館601  
 (72)発明者 亘 敏広  
 神奈川県秦野市南が丘2-2-2-304

(72)発明者 辻本 元  
 東京都杉並区成田東5-4-24  
 (72)発明者 長谷川 篤彦  
 東京都武蔵野市吉祥寺北町4-7-16